

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620070153827

UDC _____

厦 门 大 学

_____博士_____学 位 论 文

真菌环氧二烯激活 PI3K/Akt 及其对细胞运动影响的研究

The Mechanism study of Mycoepoxydiene on PI3K/Akt
Activation and the Effect on the Cell Migration

王 骁 勇

指导教师姓名: 沈 月 毛 教授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 5 月 8 日

论文答辩时间: 2012 年 6 月 5 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 6 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前 言	1
1. 肿瘤细胞转移.....	1
1.1. 概述.....	1
1.2. 肿瘤细胞侵袭.....	3
1.2.1. 胞外基质降解.....	3
1.2.2. 细胞运动.....	11
1.3. 细胞骨架重塑是细胞运动的驱动力	13
1.3.1. 微丝组装.....	16
1.3.2. 肌动蛋白结合蛋白	18
1.3.3. 整联蛋白.....	20
1.4. Rho 家族小分子 GTP 酶调控细胞骨架.....	27
1.5. 种子-土壤假说	29
2. PI3K/Akt 信号转导通路	30
2.1. 概述.....	30
2.2. PI3K/Akt 信号通路 with 肿瘤细胞转移	32
3. 海洋天然产物药物开发进展	35
4. 立题背景及立题意义	39
第二章 真菌环氧二烯调控细胞基因转录	41
1. 材料与amp;方法	41
1.1. 实验材料.....	41
1.2. 主要试剂.....	41
1.3. 主要仪器.....	41
1.4. 数据分析软件.....	42

1.5.	实验方法.....	42
1.5.1.	细胞培养和处理.....	42
1.5.2.	RNA 提取和纯化.....	42
1.5.3.	样品制备和杂交.....	42
1.5.4.	数据处理和差异表达基因筛选.....	43
1.5.5.	基因功能分析.....	43
2.	结果与分析.....	44
2.1.	实验设计.....	44
2.2.	RNA 样品质检.....	45
2.3.	基因芯片数据的标准化处理.....	46
2.4.	差异表达基因筛选.....	46
2.5.	差异表达基因的功能分析.....	48
2.5.1.	Gene Ontology 富集分析.....	48
2.6.	途径富集分析.....	56
2.6.1.	免疫反应相关途径富集.....	56
2.6.2.	细胞能量代谢和类固醇合成途径富集.....	57
2.6.3.	核糖体蛋白组分富集.....	66
3.	结论与讨论.....	68
第三章	MED 调控 PI3K/Akt 信号通路.....	71
1.	材料与方法.....	71
1.1.	细胞株及质粒.....	71
1.2.	主要试剂和耗材.....	71
1.3.	主要仪器.....	72
1.4.	实时荧光定量 PCR 实验方法.....	73
1.5.	蛋白免疫杂交 (Western blot).....	75
1.5.1.	主要溶液配方.....	75
1.5.2.	样品制备.....	76
1.5.3.	SDS-PAGE 电泳与 Western blotting 分析.....	76

1.6.	PtdIns (3,4,5) P3 免疫荧光检测方法.....	76
1.7.	细胞转染.....	77
1.8.	HPLC 检测	77
1.9.	细胞内 GSH 含量检测	78
2.	结果与分析	78
2.1.	PIK3CA 基因转录水平的检测	78
2.1.1.	PCR 引物特异性检测.....	79
2.1.2.	样品检测.....	79
2.2.	PI3K 蛋白表达水平及活性检测	80
2.3.	MED 激活 PI3K/Akt 活性的分子机制研究	83
2.3.1.	MED 促进多种细胞的 Akt 磷酸化	83
2.3.2.	MED 促进 PI3K/Akt 活化需要生长因子参与.....	84
2.3.3.	细胞内氧化还原水平对 MED 激活 PI3K/Akt 信号通路的影响.....	85
2.3.4.	AMPK、p70S6K 对 MED 促进 PI3K/Akt 信号通路的影响.....	88
2.3.5.	p38 活化对 MED 激活 PI3K/Akt 信号通路的影响.....	90
3.	讨论	92
第四章	MED 激活 PI3K/Akt 对细胞运动的影响	96
1.	材料与方法	96
1.1.	细胞、瘤株和实验动物	96
1.2.	试剂和耗材	96
1.3.	MED 纳米制剂制备.....	96
1.4.	小鼠移植瘤转移模型构建.....	97
1.4.1.	瘤株准备与接种	97
1.4.2.	给药方案.....	97
1.4.3.	数据收集和处理	97
1.5.	Boyden 小室法检测肿瘤细胞运动.....	98
1.6.	划痕实验.....	98
2.	结果与分析	98

2.1. 动物体内肿瘤转移模型检测	99
2.1.1. MED 纳米制剂溶解性评估	99
2.1.2. 纳米制剂的 MED 含量测定	99
2.2. MED 促进肿瘤细胞转移.....	99
2.3. Boyden 小室法检测肿瘤细胞趋化运动能力	101
2.4. 划痕实验检测肿瘤细胞趋化运动能力.....	103
3. 结论与讨论	105
参考文献:	108
附录: 图表索引	142
致 谢	145

Catalog

Abstrate in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Preface	1
1. Metastasis	1
1.1. Overview	1
1.2. Invasion.....	3
1.2.1. The degration of ECM.....	3
1.2.2. Cell migration.....	11
1.3. Cytoskeleton is driving force for migration	13
1.3.1. The assemble of microfilament	16
1.3.2. Actin binding proteins	18
1.3.3. Integrins.....	20
1.4. Rho familysamll GTPase modulate the cytoskeleton	27
1.5. Seed and soil hypothesis	29
2.PI3K/Akt signal transduction pathway	30
2.1. Overview	30
2.2. PI3K/Akt pathway and metastasis.....	32
3. The progress of marine nature products	35
4. Background and purpose of this Thesis.....	39
Chapter 2 Mycoepoxydiene modulated the gene transcription	41
1. Materials and methods	41
1.1. Materials.....	41
1.2. Reagents.....	41
1.3. Instruments	41
1.4. Sofeware for data exploration	42
1.5. Methods	42

1.5.1. Cell culture and treatment.....	42
1.5.2. RNA extraction and purification.....	42
1.5.3. Sample preparation and hybridize	42
1.5.4. Significant changed gene screen	43
1.5.5. Function analysis of significant changed gene	43
2. Results	44
2.1. Experiment design.....	44
2.2. RNA quality checking	45
2.3. The raw data normalization	46
2.4. Significant changed gene screen.....	46
2.5. Function analysis of significant changed gene.....	48
2.5.1. Gene Ontologyenrichment analysis	48
2.6. KEGG pathway enrichment analysis	56
2.6.1. About immuno pathways	56
2.6.2. About bioenergy metabolism and Steroid biosynthesis	57
2.6.3. About the ribosome.....	66
3. Discussion.....	68
Chapter 3 MED modulated the acivity of PI3K/Akt pathway	71
1. Materials and methods.....	71
1.1. Cell lines and plasmids.....	71
1.2. Reagents.....	71
1.3. Instruments	72
1.4. Real-time PCR.....	73
1.5. Western blot.....	75
1.5.1. Solutions preparation.....	75
1.5.2. Samples preparation	76
1.5.3. SDS-PAGE electrophoresis and blotting.....	76
1.6. PtdIns (3,4,5) P3 assay by immunofluorescence blotting.....	76

1.7. Cell transfection	77
1.8. HPLC analysis	77
1.9. Cell GSH assay.....	78
2. Results	78
2.1. PIK3CA transcription assay	78
2.1.1. The specificity assay of PCR primes.....	79
2.1.2. Sample assay	79
2.2. Assay of PI3K expression and activity	80
2.3. The mechanism of MED on PI3K/Akt activate	83
2.3.1. MED stimulated the activity of PI3K/Akt in various cell lines.....	83
2.3.2. PI3K/Akt activation by MED require growth factor participation	84
2.3.3. The cell redox status not relate to the PI3K/Akt activation	85
2.3.4. AMPK, p70S6K related to the PI3K/Akt activation by MED.....	88
2.3.5. p38 related to the PI3K/Akt activation by MED.....	90
3. Discussion.....	92
Chapter 4 The effect of MED activity PI3K/Akt on cell migration.....	96
1. Materials and methods.....	96
1.1. Cell lines, tumor lines and laboratory animals.....	96
1.2. Reagents	96
1.3. MED nanocrystals preparation	96
1.4. Preparation of metastatic model in mice.....	97
1.4.1. Tumor line preparation and transplant.....	97
1.4.2. Dosage regimen	97
1.4.3. Data collection and analysis.....	97
1.5. Boyden chamber analysis	98
1.6. Wound healing assay	98
2. Results	98
2.1. Metastatic model in mice assay.....	99

2.1.1. The resoulation assess of MED nanocrystals	99
2.1.2. The MED content of nanocrystals.....	99
2.2. MED promoted metastasis	99
2.3. Boyden chamber assay	101
2.4. Wound healing assay	103
3. Discussion.....	105
References	108
Chart index	142
Acknowledgements.....	145

摘 要

肿瘤细胞转移是肿瘤恶化的重要标志，普遍发生于肿瘤病例中，是肿瘤导致死亡的主要原因。肿瘤细胞转移是一个复杂的过程，细胞运动增强是其中一个前提条件。**PI3K/Akt** 是细胞内重要的信号蛋白，其异常活化与肿瘤发生、发展有密切联系，其介导的信号通路可促进细胞骨架重塑、基质金属蛋白酶表达、上皮-间质转化等，进而促进肿瘤细胞运动和转移。本论文研究了海洋微生物来源小分子化合物——真菌环氧二烯（**MED**）激活 **PI3K/Akt** 的分子机理，并分析了这些调控机理在 **MED** 促进乳腺癌细胞株 **MDA-MB-231** 细胞运动的作用，为 **MED** 的药物研发提供必要的指导。

研究发现，**MED** 增强了生长因子对 **PI3K/Akt** 信号通路的活化作用，而该作用与 **MED** 抑制 **AMPK**、**mTORC1/p70S6K**，激活 **p38 MAPK** 有关，并且这些蛋白激酶通过相互独立的信号通路参与了 **MED** 对 **PI3K/Akt** 信号通路的调控。

前期研究显示 **MED** 具有促进细胞骨架重塑的作用，该作用有助于细胞运动进行。通过 **Boyden** 小室实验和划痕实验检测 **MED** 对细胞运动的促进作用，结果显示 **MED** 具有一定促进肿瘤细胞运动的能力，**Lewis** 肺癌小鼠移植瘤模型也显示 **MED** 具有促进肿瘤细胞转移的效果。结合信号传导通路的研究结果对 **MED** 促进细胞运动的原因进行分析，结果显示 **PI3K/Akt** 活化可促进细胞运动；抑制 **p38 MAPK** 可削弱细胞运动能力；抑制 **mTORC1/p70S6K** 抑制细胞运动，但该作用可因同时发生的 **Akt** 活化而削弱，同时抑制 **PI3K/Akt** 和 **mTORC1/p70S6K** 可进一步加强对细胞运动的抑制；活化 **AMPK** 将削弱细胞的运动能力。**MED** 对这些信号通路的调控可能有助于肿瘤细胞的运动。

此外，本研究通过基因芯片技术分析了 **MED** 对肿瘤细胞转录组的影响，结果显示 **MED** 可能对细胞免疫、能量代谢、类固醇合成、核糖体合成途径的相关基因转录产生影响，而其中一些变化对肿瘤细胞的生长有促进作用，但切实关系还需要进一步研究证明。

关键词：真菌环氧二烯；PI3K/Akt；AMPK；mTORC1/p70S6K；p38 MAPK；
细胞运动；肿瘤细胞转移

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

Metastasis is a important symptoms of malignant tumor, it is common in tumor cases and is mainly reason for people die of cancer. Metastasis is a complex multi-step process, and the enhancement of tumor cell migration is one precondition. PI3K/Akt are important signal proteins in the cell and its abnormal activation contributes tumor generation and development. PI3K/Akt media the signal transduction to induces invasion and metastasis by cytoskeleton remodeling, MMPs expression, Epithelial-to-mesenchymal transition, et.al. Mycoepoxydiene (MED) is one compound extracted from marine microorganism, in this work, the mechanism of MED on PI3K/Akt activation and the role of this mechanism in the tumor cell migration enhancement by MED were studied. The data of this work maybe necessary for the medicine development of MED.

In this work, Mycoepoxydiene was found to promote the PI3K/Akt activation with growth factors, and this function was related separately to the suppression of AMPK and mTORC1/p70S6K activity and stimulated of p38 MAPK activity.

In former study, MED was found to promoted the cytoskeloton turnover, which was related to metastasis. Here, it was showed that MED enhance cell migration in the Boyden chamber assay and the wound healing assay, and also promoted metastasis of the Lewis lung carcinoma implanted in mice. The role of PI3K/Akt rugulation of MED were assessed in the migraton enhancment. Results showed that activation of PI3K/Akt and p38 MAPK has positive role, while mTORC1/p70S6K supression and AMPK activated would weaken the cell migration; the suppression of mTORC1/p70S6K on cell migration would be abrogated by activating PI3K/Akt. By regulating these pathway, MED may promote cell migration.

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库